د کابل پوهنتون د طبیعي علومو علمي- څېړنیزه مجله
jns.edu.af

مطالعه روش‌های تشخیصی رایج در تعیین بقایای انتی‌بیوتیک در شیر

پوهنیار نصیراحمد سروری
دیپارتمنت تکنالوژی و حفظ‌الصحه مواد غذایی، پوهنځی علوم وترنری، پوهنتون کابل، کابل، افغانستان
ایمیل: Nasirsarwary97@gmail.com

چکیده

مصرف غیرمجاز انتی‌بیوتیک‌ها در شیر اثرات زیان‌آور بر سلامت انسان داشته و مقاومت میکروبی را ایجاد می‌کند. برعلاوه اکثریت شیر مصرفی از گاوها به دست می‌آید و ممکن بخشی از این تولیدات مربوط به گاوهایی باشد که تحت درمان انتی‌بیوتیک‌ها قرار دارند. هدف این مطالعه، معرفی روش‌های شناسایی انتی‌بیوتیک‌ها در شیر و بررسی عوارض ناشی از شیر آلوده به انتی‌بیوتیک است. روش تحقیق به‌صورت مروری می‌باشد و یافته‌های این تحقیق نشان می‌دهد که؛ روش‌های ایمینوکیمیایی، کروماتوگرافی و طیف‌سنجی دقت بالا دارند؛ اما به‌دلیل هزینه بالا و زمان‌بر بودن آن کمتر استفاده می‌شوند و در حال حاضر، روش‌های میکروبی، انزایمی و بیوکیمیایی بیشتر مورد استفاده قرار می‌گیرند و کیت‌های متعدد بر اساس این روش‌ها توسعه یافته‌اند. همچنین، تکنالوژی‌های بیوسنسور به‌عنوان روش‌های نوین با آینده درخشان مطرح شده‌اند و روش‌های نشانه‌گذاری نیز نقش وقایوی دارد. در اخیر چنین نتیجه‌گیری می‌شود که روش‌های متعدد برای شناسایی انتی‌بیوتیک‌ها در شیر توسعه یافته‌است و هر روش ویژه‌گی‌های خاص خود را دارند.

واژه‌های کلیدی: انتی‌بیوتیک؛ ایمینوکیمیایی؛ بیوسنسور؛ روش نشانه‌گذاری؛ شیر؛ مقاومت میکروبی

A Study of Common Diagnostic Methods for Determining Antibiotic Residues in Milk

Nasir Ahmad Sarwary

Department of Food Technology & Hygiene, Department of Veterinary Sciences, Kabul University
Kabul, Afghanistan
Email: Nasirsarwary97@gmail.com

Abstract

The unauthorized use of antibiotics in milk poses significant risks to human health and contributes to microbial resistance. Most milk consumed comes from cows, some of which may be treated with antibiotics. This study aims to explore methods for detecting antibiotics in milk and to assess the adverse effects of contaminated milk. The research employs a review method, revealing that while immunochemical, chromatography, and spectrometry methods are highly accurate, their high costs and time demands limit their use. In contrast, microbiological, enzymatic, and biochemical methods are more widely utilized, with various kits developed based on these techniques. Moreover, biosensor technologies are emerging as innovative methods with promising potential, and Marking method serve a preventive role. In conclusion, a variety of methods for antibiotic detection in milk have been developed, each with unique advantages, highlighting the importance of addressing antibiotic contamination for public health safety.

Keywords: Antibiotic; Biosensor; Immunochemical; Marking Method; Milk; Microbial Resistance

ارجاع: سروری، ن. ا. (۱۴۰۳). مطالعه روش‌های تشخیصی رایج در تعیین بقایای انتی‌بیوتیک در شیر. د کابل پوهنتون د طبیعي علومو علمي- څېړنیزه مجله، ۱۴۰۳هـ. ل، ۷ (۲)، ۱۶۹-۱۸۸. https://jns.edu.af/jns/article/view/31/version/31

مقدمه

شیر یکی از مغذی‌ترین مواد غذایی مصرفی انسان را تشکیل می‌دهد که از جایگاه ویژه در رژیم غذایی افراد به‌خصوص کودکان و سال‌خورده‌گان برخودار است و در صورت آلوده شدن آن، تعداد زیادی افراد در معرض خطر قرار می‌گیرند. یکی از مشکلات مربوط به شیر و محصولات آن آلوده‌گی آن‌ها به انواع مختلف عوامل میکروبی و کیمیایی است (FAO, 2011).

با پیشرفت علم و تکنالوژی در صنعت مالداری و تولید شیر، مدیریت درست و نظارت دقیق بر مصرف انتی‌بیوتیک‌ها به یک ضرورت مهم تبدیل شده‌است. استفاده گسترده انتی‌بیوتیک‌ها در مالداری باعث شده‌است که بقایای این مواد در شیر و محصولات لبنی باقی بمانند. بقایای انتی‌بیوتیک در شیر نه‌تنها می‌تواند بر سلامت انسان‌ها تأثیر بگذارد بلکه بالای کیفیت و مصؤنیت محصولات لبنی نیز تأثیرگذار می‌باشد. از این لحاظ، تشخیص و کنترول دقیق بقایای انتی‌بیوتیک در شیر یک نیاز اساسی در صنعت لبنیات می‌باشد (Ferguson et al., 2012).

انتی‌بیوتیک‌ها محصولات میتابولیک میکروارگانیزم‌ها اند و در صنعت مالداری به‌منظور پیشگیری بیماری‌ها، درمان بیماری‌ها و تحریک رشد گاوها به میکانیزم‌هایی چون؛ کاهش بار میکروبی روده، بهبود جذب مواد مغذی، کاهش التهاب سیستم هاضمه (در صورت موجودیت التهاب) و تعدیل میکروبیوم روده در خوراک آن‌ها استفاده می‌شود(Smith et al., 2003). بنابراین، این موضوع می‌تواند تأثیرات قابل توجهی بالای شیر مصرفی داشته باشد. از جمله فواید استفاده از انتی‌بیوتیک‌ها، می‌توان به پیشگیری از شیوع بیماری‌های عفونی، افزایش تولید شیر و کاهش نیاز به دواهای دیگر اشاره کرد. این مزایا به بهبود سلامت گاوها و افزایش کیفیت شیر کمک می‌کند. با این حال، استفاده‌ی نادرست یا بی‌رویه انتی‌بیوتیک‌ها می‌تواند به بقایای این مواد در شیر منجر شود که ممکن است برای مصرف‌کننده‌گان مضر باشد و در نتیجه منجر به بروز واکنش‌های حساسیتی یا سایر مشکلات صحی گردد. هم‌چنین، مصرف مداوم انتی‌بیوتیک‌ها می‌تواند به ایجاد مقاومت میکروبی منجر شود که متعاقباً مشکلات جدی در درمان بیماری‌های عفونی ایجاد می‌کند (Gonzalez et al., 2005). همچنان موجودیت انتی‌بیوتیک‌ها در شیر علاوه بر مشکلات صحی، کیفیت و میزان محصولات تخمری؛ مانند پنیر و ماست را نیز کاهش می‌دهد (Daryani et al., 2014).

انتخاب روش مناسب برای تشخیص بقایای انتی‌بیوتیک به عوامل مختلف از جمله: حساسیت، دقت و زمان مورد نیاز برای نتیجه‌گیری بستگی دارد. به همین دلیل، بررسی و مقایسه روش‌های مختلف

تشخیصی به‌منظور انتخاب بهترین روش برای استفاده در صنعت لبنیات، ضروری پنداشته می‌شود (Ferguson et al., 2012).

روش‌های مختلفی برای شناسایی و تعیین مقدار بقایای انتی‌بیوتیک در شیر وجود دارد که هر یک دارای ویژه‌گی‌ها، مزایا و محدودیت‌های خاص خود است. این روش‌ها شامل: روش‌های کمی و کیفی مانند روش‌های ایمینولوژیکی، روش‌های میکروبی، روش‌های تحلیلی و بیوسنسورها می‌باشند (Gonzalez et al., 2005).

روش تحقیق

در این مقاله از روش مروری استفاده صورت گرفته است که از مقالات متعدد حدود ٤٥ مقاله علمی استفاده به عمل آمده است.

اهداف عمده تحقیق

اهداف عمده‌ی این مقاله؛ معرفی روش‌های شناسایی انتی‌بیوتیک‌ها در شیر و همچنان عوارض ناشی از شیرهای آلوده با انتی‌بیوتیک می‌باشد. برعلاوه این مقاله به صورت فرعی به اهدافی چون: تحلیل مقررات در زمینه انتی‌بیوتیک در شیر (قوانین و ستندردها) و افزایش آگاهی‌دهی نیز می‌پردازد.

اهمیت موضوع

مطالعه روش‌های تشخیصی رایج در تعیین بقایای انتی‌بیوتیک در شیر از اهمیت ویژه برخوردار است؛ زیرا این بقایا می‌توانند به سلامت عمومی آسیب برسانند و منجر به بروز مشکلاتی چون مقاومت میکروبی شوند. همچنین، موجودیت انتی‌بیوتیک‌ها در این محصول با قوانین ستندردهای غذایی در تضاد است و بر کیفیت و طعم محصولات لبنی تأثیر می‌گذارد. تشخیص به‌موقع این بقایا نه‌تنها به حفظ سلامت مصرف‌کنندگان کمک می‌کند، بلکه به بهبود شیوه‌های مدیریتی در مالداری و تولید محصولات لبنی نیز می‌انجامد. به‌طور کلی، این مطالعات نقش مهمی در تأمین سلامت و کیفیت مواد غذایی دارند.

ضرورت انجام تحقیق

دلیل انجام این مطالعه به چندین عامل کلیدی مرتبط است. اولاً، نگرانی‌های صحی ناشی از موجودیت بقایای انتی‌بیوتیک در شیر و تأثیرات آن بر سلامت عمومی اهمیت حیاتی دارد. چنانچه با افزایش مصرف انتی‌بیوتیک‌ها در مالداری، خطرات بالقوه برای مصرف‌کننده‌گان، به خصوص در مورد بروز مقاومت میکروبی، شکل می‌گیرد. شناسایی و کنترول این بقایا می‌تواند به کاهش این مشکلات کمک

نماید و همچنان مصؤنیت محصولات لبنی را تضمین کند. برعلاوه، افزایش آگاهی در میان فارم‌داران، تولیدکننده‌گان و مصرف‌کننده‌گان درباره مدیریت، استفاده، عوارض و کنترول انتی‌بیوتیک‌ها در پروسه تولید شیر امر ضروری پنداشته می‌شود.

انتی‌بیوتیک‌های رایج در حیوانات شیری

در صنعت مالداری، به‌ویژه در تولید شیر، استفاده از انتی‌بیوتیک‌ها اکثراً برای درمان بیماری‌های عفونی در حیوانات صورت می‌گیرد. این انتی‌بیوتیک‌ها می‌توانند به‌طور مستقیم بالای سلامتی حیوان تأثیر بگذارند و همچنین ممکن در شیر آن‌ها وجود داشته باشند. بنابراین، نظارت بر مصرف و کنترول بقایای انتی‌بیوتیک در شیر ضروری است (Van Boeckel et al., 2015).

انتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده در صنعت مالداری شامل موارد ذیل اند:

۱. دسته پنی‌سیلین‌ها. مانند: پنی‌سیلین و امپی‌سیلین که به‌طور گسترده برای درمان عفونت‌های باکتریایی استفاده می‌شوند.
۲. سیفالوسپورین‌ها. مانند: سیفالکسین و سیفالوتین که برای درمان عفونت‌های شدیدتر به کار می‌روند.
۳. تتراسیکلین‌ها. مانند: تتراسیکلین و دوکسی‌سیکلین که برای درمان عفونت‌های مختلف و در بعضی موارد به عنوان افزودنی غذایی برای پیشگیری از بیماری‌ها استفاده می‌شوند.
۴. ماکرولیدها. مانند: اریترومایسین و کلاریترومایسین که برای درمان بعضی عفونت‌ها و به‌عنوان دوای ضدباکتریایی استفاده می‌شوند.
۵. فلوروکینولون‌ها. مانند: انروفلوکساسین و سیپروفلوکساسین که برای درمان عفونت‌های شدید و مقاوم در برابر دواهای دیگر به کار می‌روند(McEwen et al., 2018 and OIE, 2016).

بقایای دوایی

بقایای دوایی (Drug Residues) به مقادیر کوچک از دواها اطلاق می‌شود که ممکن است پس از مصرف دوا در بدن حیوانات باقی بماند و به محصولات حیوانی مانند: شیر، گوشت، یا تخم‌مرغ منتقل شود. این بقایا می‌توانند ناشی از مصرف دوا در درمان بیماری‌ها یا پیشگیری از آن‌ها باشند (IARC, 2021 and WHO, 2010).

تعریف بقایای دوایی

بقایای دوایی به مقادیر قابل اندازه‌گیری دواهای مصرف شده در بدن حیوانات اطلاق می‌شود که پس از گذشت زمان و طی پروسه‌های طبیعی میتابولیزم و دفع، در محصولات حیوانی باقی می‌مانند. این بقایا شامل: انتی‌بیوتیک‌ها، هورمون‌ها و دواهای ضد پارازیتی می‌شوند(IARC, 2021 and WHO, 2010).

چگونگی به وجود آمدن بقایای دوایی

۱. .مصرف دوا: دواهای مختلف برای درمان بیماری‌ها یا پیشگیری از بیماری‌ها در حیوانات مصرف می‌شوند. این دوا ممکن به‌صورت خوراکی، تزریقی، یا از طریق آب یا خوراک به حیوانات داده شوند.
۲. میتابولیزم دواها: پس از ورود دوا به بدن حیوان، سیستم‌های میتابولیکی بدن آن را تجزیه و تغییر می‌دهند. این پروسه به عنوان میتابولیزم شناخته می‌شود و می‌تواند منجر به تغییر کیمیایی دواها شود.
۳. دفع دوا: دواها و میتابولیت‌های آن‌ها از طریق ادرار، مدفوع، یا شیر به بیرون از بدن دفع می‌شوند. ممکن بعضی این ترکیبات به‌طور کامل دفع نشوند و در انساج یا محصولات حیوانی باقی بمانند.
۴. بقایای دوایی: زمانی‌که حیوانات تحت درمان با دوا قرار می‌گیرند، مقادیر کوچک دوا یا میتابولیت‌های آن ممکن در انساج و محصولات حیوانی باقی بمانند. اگر این دواها به مدت کافی قبل از برداشت محصول حیوانی (مانند شیر یا گوشت) از بدن حیوانات خارج نشوند، در نتیجه به‌عنوان بقایای دوایی در محصول باقی می‌مانند(FAO, 2010).

عوارض بقایای انتی‌بیوتیک‌ها در شیر بالای صحت عامه

زمانی‌که انتی‌بیوتیک‌ها به‌صورت تزریقی، موضعی و یا خوراکی تجویز شوند، مقداری از آن در بدن تجمع می‌نماید. این بقایا در خون، انساج عضلی و شیر قابل تشخیص است(۵). اثرات زیان‌آور انتی‌بیوتیک‌ها در انسان‌ها شامل موارد ذیل اند:

- گسترش سترین‌های مقاوم باکتری‌ها و گسترش عفونت‌های مقاوم به انتی‌بیوتیک در انسان؛
- ایجاد انواع واکنش‌های حساسیتی به خصوص در افراد حساس در مقابل انتی‌بیوتیک؛
- ممانعت تشخیص میکروارگانیزم‌های بیماری‌زای کلینیکی؛
- ایجاد اختلال در عملکرد میکروفلورهای طبیعی دستگاه هضمه؛

- اثرات سرطان‌زایی و جهش‌زایی(Zhang et al., 2015 and EFSA, 2014).

همچنین عوارض صنعتی انتی‌بیوتیک‌ها شامل موارد ذیل اند(Tornadijo et al., 2017 and Wang et al., 2018):

- جلوگیری از کارکرد کشت‌های آغازگر (مایه‌گی) جهت تولید محصولات لبنی و انعقاد ضعیف در مرحله تولید؛
- از بین رفتن باکتری‌های مفید که در تولید ماست و پنیر و سایر محصولات تخمری به کار می‌روند؛
- مهار تولید اسید به وسیله مایه‌گی آغازگر؛
- مهار باکتری‌های مولد لکتیک اسید و تأثیر سوء بالای محصولات تخمری لبنی و
- ایجاد خطا در شمارش میکروبی شیرخام (Tornadijo et al., 2017 and Wang et al., 2018)

بنابراین، رعایت حد مجاز انتی‌بیوتیک در شیر بسیار مهم تلقی می‌شود.

میزان مجاز انتی‌بیوتیک در شیر

میزان مجاز انتی‌بیوتیک‌ها در شیر جهت اطمینان از سلامت مصرف‌کنندگان و حفظ کیفیت شیر بسیار مهم تلقی می‌گردد. این مقادیر مجاز به‌طور دقیق توسط سازمان‌های صحی و نظارتی تعیین شده و معمولاً بر اساس ستندردهای جهانی یا ملی تنظیم می‌شوند(FDA, 2018).

بیشترین مقدار بقایای انتی‌بیوتیک‌ها در شیر پس از گوشت یافت می‌شود. همچنان نکته قابل اهمیت اینست که مقدار بقایای انتی‌بیوتیک نباید از حداکثر مجاز (Minimum Residual Limit) در محصولات حیوانی تجاوز نماید و ستندرد بقایای انتی‌بیوتیک در مواد غذایی با منشأ حیوانی به عنوان حداکثر بقایای مجاز دوا (Minimum Residual Limit /MRL) بر حسب میکروگرام بر کیلوگرام (µg/kg)تعریف می‌شود (Kebede et al., 2014). در جدول ذیل مقادیر مجاز بقایای انتی بیوتیک در شیر بر اساس ستندرد کمیسیون قوانین غذایی (Codex) نشان داده شده است (Codex, 2015):

جدول۱: مقادیر مجاز بقایای انتی‌بیوتیک در شیر(Codex, 2015)

دسته انتی‌بیوتیک	اسم دوا	میزان مجاز برحسب (µg/kg)
بیتالکتام	پنی‌سیلین	۴
	سفتیوفور	۱۰۰
تتراسکلین	تتراسکلین	۱۰۰
	اوکسی تتراسکلین	۱۰۰
	کلوروتتراسکلین	۱۰۰
سلفاناماید	سلفادیمیدین	۲۵
ماکرولید	اسپیرامایسین	۱۰۰

امینوگلیکوزید	جنتامایسین	۲۰۰
	استرپتومایسین	۲۰۰
	نئومایسین	۵۰۰

روش‌های تشخیص بقایای انتی‌بیوتیک در شیر

برای تشخیص انتی‌بیوتیک‌ها در شیر، می‌توان از روش‌های تحلیلی مختلف استفاده کرد، برخی از این روش‌ها عبارتند از:

۱. روش‌های کروماتوگرافی. روش‌های پرکاربرد کروماتوگرافی که برای دریافت بقایای انتی‌بیوتیک در شیر استفاده می‌شوند، قرار ذیل اند:

الف. کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (High-Performance Liquid Chromatography/HPLC): این روش برای تفکیک و شناسایی انتی‌بیوتیک‌ها در نمونه‌های شیر کاربرد دارد، با استفاده از HPLC، می‌توان انتی‌بیوتیک‌ها را به‌صورت دقیق دریافت و شناسایی کرد (Horvath., 1976).

ب. کروماتوگرافی لایه نازک با کارایی بالا (High-Performance Thin-Layer Chromatography/HPTLC): روش تحلیلی HPTLC امکان تعیین کمی‌و کیفی بقایای دوایی به شمول انتی‌بیوتیک را در محصولات غذایی با مشتقات حیوانی (شیر و گوشت) فراهم می‌کند؛ اما امروزه کاربرد آن به دلیل توسعه سایر تخنیک‌های پیشرفته؛ مانند کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) به سرعت کاهش یافته است. اخیراً گزارشاتی موجود است که از این روش برای تعیین بقایای دوایی وترنری؛ مانند سلفونامایدها، کلنبوترول و سایر آگونیست‌ها، نیترومیدازول و دواهای تایروستاتیک استفاده شده‌است (Shankar et al., 2010).

ج. کروماتوگرافی مایع-طیف‌سنجی حجمی(Liquid chromatography-Mass spectrometry/LC-MS): در این روش از ترکیب کروماتوگرافی مایع با طیف‌سنجی حجمی‌برای شناسایی و اندازه‌گیری دقیق انتی‌بیوتیک‌ها استفاده صورت می‌گیرد (Tasci et al., 2021).

۲. روش‌های طیف‌سنجی (Spectroscopy): از جمله روش‌های طیف‌سنجی، طیف‌سنجی نوع-UV Visو طیف‌سنجی فلورسنس جهت تشخیص انتی‌بیوتیک‌ها در شیر با سایر روش‌ها به‌صورت مشترک بیشتر مورد استفاده قرار می‌گیرد، این روش‌ها به‌خصوص برای انتی‌بیوتیک‌هایی‌که در ترکیبات خود فلوروسنت دارند، استفاده می‌شود(Wang et al., 2016).

الف. طیف سنجی حجمی(Mass Spectrometer/MS): این روش برای شناسایی و تعیین کمیت ترکیبات خاص در یک نمونه از جمله انتی‌بیوتیک‌ها استفاده می‌شود. همچنان این روش بسیار حساس بوده و می‌تواند طیف وسیع انتی‌بیوتیک‌ها را در شیر تشخیص دهد(Tasci et al., 2021).

۳. آزمایشات میکروبیولوژیکی: از جمله روش‌های معمول برای تشخیص انتی‌بیوتیک‌ها در شیر بوده، که این آزمایشات بر اساس حساسیت میکروب‌های شیر در مقابل انتی‌بیوتیک‌ها، عمل می‌نمایند و یکی از پرکاربردترین روش‌های تحلیلی غربال‌گری اند. اساس این روش مبتنی بر واکنش بین باکتری‌ها و دواهای ضد میکروبی بوده که در نمونه‌های بیولوژیکی وجود دارند. از جمله دو روش رایج برای سنجش مهار میکروبیولوژیکی بیشتر استفاده می‌گردد که شامل آزمایش تیوب و پلیت (Tube and plate test) می‌باشند. اکنون، کیت‌های آزمایش مهار میکروبیولوژیکی در بازار به حد زیادی عرضه گردیده که می‌توانند نمونه‌های زیادی را به سرعت آزمایش کنند(Edberg et al., 2015).

الف. آزمایش تیوب: این آزمایش شامل یک وسط رشد تلقیح شده با باکتری بوده که با نشانگر pH یا ردوکس تکمیل گردیده است. در این روش نمونه‌های بیولوژیکی به تیوب آزمایش اضافه شده و در صورت عدم موجودیت مواد ضد میکروبی مورد نظر در نمونه بیولوژیکی، باکتری شروع به رشد کرده و اسید تولید می‌نمایند که در نتیجه باعث تغییر رنگ قابل تشخیص می‌شود. برعکس، اگر مواد ضد میکروبی در نمونه بیولوژیکی وجود داشته باشد، رشد باکتری مهار شده و هیچ نوع تغییر رنگ در تیوب ایجاد نخواهد شد(Forbes et al., 2007).

ب. آزمایش پلیت: در این آزمایش پلیت حاوی آگر مغذی با باکتری خاص تلقیح شده و نمونه‌های بیولوژیکی در سطح پلیت کشت می‌شوند. اگر مواد ضد میکروبی مورد نظر در نمونه بیولوژیکی وجود نداشته باشد، باکتری‌ها در سراسر پلیت شروع به رشد می‌کنند. در صورتی‌که انتی‌بیوتیک مورد نظر در نمونه بیولوژیکی وجود داشته باشد، هیچ نوع رشد باکتریایی در روی نمونه صورت نخواهد گرفت(Forbes et al., 2007).

ج. آزمایش سلندر پلیت: این روش برای تشخیص پنی‌سیلین در شیر استفاده می‌شود و در این روش میکروارگانیزم‌های خاص که در برابر مقادیر اندک بقایای انتی‌بیوتیک در شیر حساس اند را وارد وسط آگر (Agar) می‌کنند و آگَر (Agar) به پلیت‌ها منتقل شده و بعداً بالای آن قوطی‌های مخصوص و کوچک شیشه‌یی معقم قرار می‌گیرد و قوطی‌ها با نمونه‌های شیر و یا محلول‌های ستندرد انتی‌بیوتیک‌ها پر می‌شوند. در اخیر پس از انکوبیشن پلیت‌ها (در حرارت و زمان معین)، در صورت موجودیت انتی‌بیوتیک در نمونه‌های شیر، رشد میکروارگانیزم مشاهده نخواهد شد. بنابراین، ناحیه مهاری یا عدم

رشد تشکیل می‌گردد. سپس سطح ناحیه مهارشده اندازه‌گیری شده و با سطح ناحیه مربوط به ستندرد انتی‌بیوتیک مقایسه می‌شود. معمولاً در این آزمایش از باسیلوس سوبتیلس (*Bacillus subtilis*)، استافیلوکوکوس اوریوس (*Staphylococcus aureus*) و سارسینالوتیا (*Sarcina lutea*) کار گرفته می‌شود(Vanderhaeghen et al., 2010).

د. آزمایش دیسک: شیوه‌های مختلفی در این روش کاربرد دارند که اصول تمامی آن‌ها مشابه و برپایه جستجوی انتی‌بیوتیک در شیر است. در این روش نیز میکروارگانیزم‌های خاصی که به مقادیر بسیار کم انتی‌بیوتیک‌ها حساس اند، انتخاب و در سطح آگر کشت می‌شوند. سپس دیسک‌های کاغذی با قطر معین را به نمونه‌های شیر آغشته کرده و آن‌ها را در سطح آگر قرار می‌دهند، سپس از هر کدام انتی‌بیوتیک‌های مورد نظر ۳ الی ۵ غلظت ستندرد تهیه کرده و پس از آغشته نمودن دیسک‌های کاغذی، هریک از این غلظت‌ها را نیز در پلیت آگر قرار می‌دهند. پلیت‌ها به مدت زمان معین (مربوط به نوع میکروارگانیزم) انکوبیت می‌شوند. هرگاه شیر حاوی انتی‌بیوتیک باشد این شیر از رشد میکروارگانیزم جلوگیری کرده و یک ناحیه‌ی مهارشده را در اطراف دیسک تشکیل می‌دهد(Zdolec et al., 2016).

قطر نواحی مهارشده با کولیس (خط کش مخصوص) اندازه‌گیری شده و با نواحی مهاری مربوط به غلظت‌های ستندرد انتی‌بیوتیک مقایسه می‌شوند. نواحی بزرگ‌تر از یک اندازه معین به عنوان نتیجه مثبت و نواحی کوچک‌تر از آن به‌عنوان نتیجه منفی تلقی خواهند شد. از جمله میکروارگانیزم‌هایی‌که در این روش به کار می‌روند، می‌توان به باسیلوس سوبتیلیس (*Bacillus subtilis*)، باسیلوس سریوس (*Bacillus cereus*) و باسیلوس استیروترموفیلوس (*Bacillus stearothermophilus*) اشاره کرد(Zdolec et al., 2016).

هـ. آزمایش سریع دیسک: در این روش نیز از باکتری باسیلوس استیروترموفیلوس استفاده شده و وسط کشت مورد استفاده تریپتکاز، عصاره خمیرمایه و گلوکوز آگر می‌باشد که در آن اسپورهای باسیلوس کشت می‌گردد. قطر دیسک‌های کاغذی در این روش ۱۳ میلی متر بوده و بعد از آغشته کردن دیسک‌ها با نمونه‌های شیر، آن‌ها را در روی پلیت حاوی وسط کشت قرار می‌دهند و پلیت‌ها را به مدت ۱,۵ تا ۲,۵ ساعت در حرارت ٦٥ درجه سانتی گراد انکوبیت می‌کنند. حساسیت این روش در مورد بقایای پنی‌سیلین به غلظت ۰,۰۰۵ واحد بین المللی بر میلی لیتر بوده که با افزودن محلول ۵-۳-۲- ترای فینایل تیترازولیم کلورواید به وسط کشت حساسیت آن برای پنی‌سیلین به ۰,۰۰۲ واحد بین المللی بر میلی لیتر افزایش می‌یابد(Zdolec et al., 2016).

و. آزمایش انتشار اگر انتی‌بیوتیک در شیر: در این روش نمونه‌های شیر را مستقیماً به وسط کشت حاوی سپورهای میکروارگانیرم حساس اضافه می‌نمایند و نتیجه را با توجه به تغییر رنگ وسط قرائت می‌کنند. تغییر رنگ ناشی از واکنش مواد مترشحه‌ی باکتری با معرف‌های اضافه شده در وسط کشت است. از آزمایشات متداول این روش می‌توان به آزمایش دلووپی (Delvo P test)، دلووس و پی (Delvos and P test) و آزمایش کوپن (Coupon test) اشاره کرد(Ali et al., 2015).

ز. آزمایش کشت ماست (Yoghurt culture test): این آزمایش که به‌عنوان آزمایش تخمر ماست یا آزمایش انکوبیشن ماست نیز شناخته می‌شود، نحوه عملکرد این آزمایش شامل چهار مرحله بوده که در مرحله اول نمونه آماده‌سازی شده (یک مقدار شیر با کشت مایه‌گی ماست تجاری مخلوط می‌شود که حاوی سترین‌های خاص باکتری لکتوباسیلوس بولگاریکوس و استرپتوکوکوس ترموفیلوس است). در مرحله دوم انکوبیشن نمونه صورت گرفته (مخلوط کشت شده در حرارت کنترول شده برای مدت خاص گذاشته می‌شود)، در مرحله سوم نمونه تخمر شده (در طول انکوبیشن، باکتری‌های موجود در کشت مایه‌گی، لکتوز شیر را به لکتیک اسید تبدیل می‌کنند) و در مرحله چهارم نمونه مشاهده (بعد از انکوبیشن، ماست از نظر ویژه‌گی‌هایی مانند بافت، قوام و اسیدیتی به صورت چشمی بررسی می‌شود) و نتیجه‌گیری صورت می‌گیرد. در صورت تولید ماست غلیظ نمونه فاقد انتی‌بیوتیک و در صورت رقیق بودن ماست تولید شده نمونه حاوی انتی‌بیوتیک اعلام می‌گردد. از این آزمایش بیشتر خریداران محلی شیر استفاده می‌نمایند؛ اما در فابریکات بزرگ لبنی این آزمایش ندرتاً کاربرد دارد. برعلاوه این آزمایش ارزان و ساده بوده؛ اما دقت پایین دارد(Bonyadian et al., 2020 and Mohsenzadeh et al., 2008).

٤. روش‌های ایمینوکیمیایی: فعل و انفعالات انتی‌جن-انتی‌بادی برای سال‌های زیادی جهت شناسایی طیف گسترده مواد تشکیل‌دهنده‌ی مواد غذایی، از جمله مواد مسئول تقلب و آلوده‌گی استفاده شده، که واکنش انتی جن و انتی بادی برای تشخیص بقایای دواهای وترنری در محصولات غذایی مشتق شده از حیوانات، بسیار خاص و مفید بوده است. از جمله روش‌های ایمینوکیمیایی پرکاربرد برای تشخیص انتی‌بیوتیک‌ها در شیر، می‌توان به آزمایشات ELISA و آزمایش ایمینوفلورسنس اشاره کرد، این روش‌ها بر اساس واکنش انتی‌بادی‌ها با انتی‌بیوتیک‌ها عمل می‌نمایند. اساس این روش تشکیل کمپلکس انتی جن– انتی بادی بوده و در این روش اندازه‌گیری انتی جن به دو شکل یکی معمولی (Ag)و دیگری نشان‌دار (*Ag) که به انتی بادی اضافه می‌شود، صورت می‌گیرد و مقدار انتی بادی در حدی می‌باشد که برای ترکیب شدن با هر دو نوع انتی جن افزوده شده کافی نخواهد بود. بنابراین، به

علت محدودیت محل‌های پیوندشونده در انتی بادی، دو نوع انتی جن در تشکیل کمپلکس با هم رقابت می‌کنند و در اخیر نتیجه آن ارزیابی می‌گردد(Ahmed et al., 2020 and Zhang et al., 2018):

الف. آزمایش ایمینوسوربنت مرتبط با انزایم یا الیزا (Enzyme-linked Immunosorbent Assay/ELISA): این روش از انتی بادی‌ها برای شناسایی انتی‌بیوتیک‌های خاص در نمونه‌های شیر استفاده می‌شود. همچنان این روش سریع و حساس بوده و با استفاده از این روش می‌توان چندین انتی‌بیوتیک را به‌طور هم‌زمان تشخیص کرد. کیت‌های الیزا به صورت تجاری در دسترس بوده و به‌طور وسیع در صنایع لبنی و لابراتوارهای کنترول کیفیت استفاده می‌شوند. همچنین در این روش نتایج در مدت چند دقیقه ارائه می‌شود (Fan et al., 2012 and Huang, 2014).

ب. آزمایش ایمینو فلورسنس (Fluorescence immunoassay): این روش متشکل از بخش ایمینولوژیک (انتی‌جن خاص) و بخش فلورسنت (معرف ستندرد برای شناسایی انتی‌جن) بوده که در این روش نیاز به مرحله شستشو یا جداسازی نمی‌باشد و این آزمایش مبتنی بر افزایش پلورایزیشن فلورسنس انتی‌جن کوچک حاوی نشان‌گر با فلورسنت (ردیاب) با اتصال به انتی بادی خاص عمل می‌کند (Smith et al., 2008).

ج. آزمایش ایمینوکیمیایی لومینسینس (Chemiluminescent immunoassay/CLIA): CLIA در ابعاد مختلف هم‌چون تجزیه و تحلیل شیر و دوا، مصؤنیت مواد غذایی و نظارت بر محیط زیست قابل استفاده می‌باشد و بنابر دلایلی چون؛ تجزیه و تحلیل ساده، عملکرد سریع، حساس و انتخابی به‌طور گسترده مورد استفاده قرار گرفته است. CLIA از دو بخش تشکیل شده که شامل سیستم واکنش مصؤنی (Immune response system) و سیستم تجزیه و تحلیل لومینسنس کیمیایی (Chemiluminescence analysis system) اند. سیستم واکنش مصوونی سبستریت را به‌صورت مستقیم یا انزایم‌های موجود بر روی انتی‌جن‌ها یا انتی‌بادی‌ها نشانه‌گذاری می‌کند و سیستم تجزیه و تحلیل لومینسنس کیمیایی، در جواب واکنش مصوونی، اوکسیدانت یا انزایم را در سبستریت اضافه می‌کند. در نهایت، پس از اوکسیدیشن ماده‌ی لومینسنس کیمیایی، یک‌نوع میانجی خاص تشکیل شده که نور فوتون (Photon) تولید می‌نماید و با استفاده از وسایل اندازه‌گیری موج میانجی نور تشخیص می‌گردد (Chen et al., 2012).

د. واکنش زنجیر پولی‌میریز (Polymerase chain reaction/PCR): این روش می‌تواند موجودیت DNAباکتریایی مقاوم به انتی‌بیوتیک‌ها را تشخیص دهد. همچنان این روش بسیار حساس بوده و با

استفاده از این روش می‌توان سطوح بسیار پایین جین‌های مقاوم در مقابل انتی‌بیوتیک را تشخیص کرد. در این روش نتایج در مدت چند ساعت ارائه می‌شود(Gao et al., 2011).

هـ. آزمایش رادیوایمیونو (Radioimmunoassay): این روش جهت تشخیص کمی‌و کیفی انتی‌بیوتیک‌ها و هورمون‌ها در نمونه‌هایی‌که منشأ مختلف دارند (حیوانی، انسانی و زراعتی)، استفاده می‌شود و برای ایجاد واکنش رقابتی با انتی‌بادی‌ها، از انتی‌جن‌های نشان‌گر و بدون نشان‌گر همراه با ایزوتوپ استفاده می‌شود؛ اما در ارتباط به این موضوع مطالعات کمتری انجام شده و برای انکشاف و پیشنهاد این روش جهت تشخیص کمیت بقایای انتی‌بیوتیک در محصولات مایع (شیر و سایر مایعات) مطالعات بیشتر نیاز است(Fan et al., 2012).

۵. روش رنگ‌آمیزی یا نشانه‌گذاری انتی‌بیوتیک در شیر: برای جلوگیری از مخلوط شدن شیرهای حاوی انتی‌بیوتیک با شیرهای طبیعی، از رنگ‌آمیزی انتی‌بیوتیک‌های متداول در وترنری (درمان التهاب پستان) استفاده می‌شود. اساس روش افزودن مواد رنگی بی‌اثر در محصولات انتی‌بیوتیکی است که به‌طور کامل موجودیت انتی‌بیوتیک را در مخازن شیر مشخص می‌کند. از جمله رنگ‌هایی که به این منظور استفاده می‌شود می‌توان از رنگ سبز خوراکی شماره ٤ نام برد که به انتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین (تطبیق‌شونده از راه لاخ پستان) اضافه می‌شود. هرگاه غلظت بقایای پنی‌سیلین در شیر بیش از ۰،۰۱ واحد بین المللی بر میلی لیتر باشد، شیر سبزرنگ می‌شود. برای تشخیص غلظت‌های کمتر انتی‌بیوتیک در شیر می‌توان آن‌ها را از ریزین تبادل آیونی (Ion exchange resin) عبور داد، تا رنگ تیره شود. این روش فوق‌العاده ساده و ارزان بوده و در برخی از کشورها؛ مانند سویس استفاده می‌شود(Akbari et al., 2017).

٦. روش‌های بیوسنسور یا حس‌گرزیستی (Biosensors) و مواد نانو (Nano-materials): حس‌گرزیستی یکی از روش‌های تحلیلی غربال‌گری برای تحلیل بقایای دواهای وترنری بوده و این حس‌گرها از مالیکول‌های بیولوژیکی؛ مانند انزایم‌ها یا انتی‌بادی‌ها استفاده می‌کنند. در پروسه تشخیص، مالیکول‌ها به یک مبدل (Transducer) جفت شده که در نتیجه به واکنش بین بقایای دوا و مالیکول بیولوژیکی متصل، پاسخ می‌دهد و هشدار بیوکیمیایی حاصل شده به‌صورت نوری مشاهده گردیده یا به سیگنال الکترونیکی تغییر می‌یابد که علاوه براین، توسط یک ابزار مناسب روشن می‌شود. آزمایش‌کننده‌های حس‌گرزیستی قادر به شناسایی هم‌زمان انتی‌بیوتیک‌ها و آفت‌کش‌های چنددسته‌یی در نمونه‌های بیولوژیکی اند. حس‌گرهای الکتروکیمیایی به دلیل مزایایی مانند حساسیت برتر، سرعت و قابلیت کوچک‌سازی از طریق ترکیب پتانسیل(E)، جریان(I)، بار (Q) و زمان(t)، اخیراً قابل توجهی

زیادی در تشخیص انتی‌بیوتیک‌ها قرار گرفته اند. به‌طور معمول در این روش‌ها از سه الکترود استفاده می‌شود (البته می‌توان از سیستم‌های دو الکترودی یا چهار الکترودی نیز استفاده کرد): الکترود کار، الکترود مرجع و الکترود کمکی یا شمارنده. الکترود کار (کاربن، طلا یا پلاتین) به‌طور کلی با استفاده از عناصر تشخیص‌دهنده‌ی زیستی به‌منظور دست‌یابی برای انتقال حساس و انتخابی تحلیل‌گر مورد نظر عیار می‌شود. الکترودهای شمارنده و مرجع، قوه الکترود کار را کنترول می‌کنند و مسیر را برای جریان تولید شده فراهم می‌کنند و اندازه‌گیری با استفاده از دستگاه پوتنشیواستات (Potentiostat) انجام می‌شود. الکترود کار جزء اصلی حس‌گرهای الکتروکیمیایی بوده که رفتار آن عملکرد سنسور را تعیین می‌کند. عمده‌ترین روش‌های الکتروتحلیلی شامل پتانسیومتری، ولتامتری (و پلاروگرافی)، آمپرومتری، کولومتری، هدایت‌سنجی و الکتروگرانش سنجی است(Patel, 2002; Möhrle et al., 2007 and Ferrini et al., 2008).

الف. حس‌گرهای زیستی الکتروکیمیایی مبتنی بر پولی‌میر مالیکولی چاپ شده (MIP): MIP (Molecularly imprinted polymer) ها مواد مصنوعی با حفره‌های اتصال انتخابی یا مکان‌های شناسایی برای یک هدف خاص بوده که گیرنده‌های طبیعی را تقلید می‌کنند(Bitas et al., 2018).

ب. حس‌گرهای زیستی الکتروکیمیایی مبتنی بر انزایم: حس‌گرهای زیستی انزایمی‌مبتنی بر شناسایی بیولوژیکی بوده؛ بنابراین، انزایم‌ها باید برای کتلیز کردن واکنش بیوکیمیایی خاص و همچنین پایدار بودن در شرایط عملیاتی مورد نیاز (با توجه به pH، حرارت و غیره) موجود باشند. استفاده از گیرنده‌ها و نشان‌گرهای انزایمی‌با مواد نانو به شناسایی انتی‌بیوتیک‌های مختلف در این روش کمک کرده است. چندین انزایم، مانند HRP (Horseradish peroxidase) ، PCN (Phenazine-1-carboxamide) ، GOx (Glucose oxidase) و غیره، همراه با مواد نانوی مختلف، از جمله مواد نانوی مبتنی بر کاربن و ذرات مقناطیسی نانو، برای استفاده در تشخیص الکتروکیمیایی انتی‌بیوتیک‌ها گزارش شده‌اند(Xiu et al., 2020).

۷. روش‌های انزایمی‌و بیوکیمیایی: این آزمایشات بر پایه فعالیت انزایم‌ها عمل نموده و فعالیت آن‌ها را تشخیص می‌کنند (Abouzied et al., 2012 and Althaus et al., 2001).

الف. آزمایش بیتا استار (Beta star test): از جمله آزمایشات بسیار متداول در زمینه تعیین انتی‌بیوتیک در شیر است. این آزمایش برای تشخیص سریع انتی‌بیوتیک در شیر به نام بیتالکتام (پنی‌سیلین و سفالوسپورین) با تعاملات رسپتوری به کار می‌رود. ترکیب میزان خاصی از رسپتور با میزان مشخصی از شیر منجر به واکنش میان رسپتور و بیتالکتام موجود در شیر می‌شود. در مرحله دوم کمپلکس ایجاد

شده بین رسپتور و بیتالکتام (در صورت موجودیت) بر روی ورقه باریک اسیتات سلولوز که شامل یک باند بیومالیکول تشخیص‌دهنده‌ی رسپتور است، انتقال پیدا می‌کند. اگر رسپتور در تماس با بیتالکتام نباشد، باند بیومالیکول تمام مالیکول‌های رسپتور را در بر می‌گیرد که منجر به تشکیل یک نوار سرخ خواهد شد؛ اما در صورتی‌که رسپتور توسط مالیکول‌های بیتالکتام موجود در شیر پوشیده شده باشد، هیچ باندی تشکیل نمی‌شود. این آزمایش نیز به‌صورت کیت تجارتی در بازار موجود می‌باشد(Abouzied et al., 2012).

ب. روش پن‌زایم (Penzym enzymatic test): اساس این آزمایش بر مبنای مهار انزایم DD-کاربوکسی پپتیدیز توسط انتی‌بیوتیک‌های بیتالکتام بوده که همراه با تغییر رنگ محیط از رنگ نارنجی به رنگ زرد همراه است. این روش قادر به تشخیص بقایای انتی‌بیوتیک در شیر در غلظت‌های ۰,۰۰۴ الی ۰,۰۱۲ واحد بر میلی لیتر می‌باشد. همچنان این آزمایش نیازمند زمان کم‌تر بوده و نتایج آن در مدت بیست دقیقه قابل بررسی است؛ اما طیف انتی‌بیوتیک‌هایی‌که با این روش قابل شناسایی اند، اندک است (تنها پنی‌سیلین‌ها و سفالوسپورین‌ها قابل تشخیص خواهند بود). همچنین در ۱۶ الی ۱۷ درصد موارد با پاسخ‌های مثبت کاذب همراه است(Althaus et al., 2001).

یافته‌ها

در این مطالعه، روش‌های مختلف تشخیص بقایای انتی‌بیوتیک در شیر و اضرار مرتبط با آن مورد بررسی قرار گرفت. یافته‌های اصلی شامل موارد زیر است:

- استفاده انتی‌بیوتیک‌ها اکثراً برای درمان بیماری‌های عفونی در حیوانات مورد استفاده قرار می‌گیرد (Van Boeckel et al., 2015).
- یکی از اثرات عمده زیان‌آور انتی‌بیوتیک‌ها در انسان‌ها ایجاد مقاومت میکروبی می‌باشد (Zhang et al., 2015 and EFSA, 2014).
- روش‌های دقیق: ELISA، PCR و کروماتوگرافی مایع با فشار بالا (HPLC) از دقت بالایی برخوردار هستند و قادر به شناسایی بقایای انتی‌بیوتیک با حساسیت بالا می‌باشند (Fan et al., 2012; Huang, 2014; Gao et al., 2011 and Shankar et al., 2010).

- کیت‌های تشخیصی: کیت‌هایی چون بیتا استار و دلووتست به دلیل ساده‌گی، سرعت و هزینه کمتر، به طور افزایشی در صنعت لبنیات برای تشخیص کیفی انتی‌بیوتیک‌ها استفاده می‌شوند (Abouzied et al., 2012 and Ali et al., 2015).
- آزمایشات میکروبی: این آزمایشات مورد کاربرد زیاد قرار دارند و همچنان به دلیل زمان‌گیر بودن آزمایش، کیت‌های آن‌ها نیز تولید می‌گردد (Edberg et al., 2015).
- روش‌های رنگ‌آمیزی یا نشانه‌گذاری: برای جلوگیری از مخلوط شدن شیرهای حاوی انتی‌بیوتیک با شیرهای طبیعی، از روش رنگ‌آمیزی انتی‌بیوتیک‌ها در فارم‌ها استفاده می‌شود (Akbari et al., 2017).
- حس‌گرهای زیستی: این تکنالوژی، به‌خصوص در ترکیب با نانوتکنالوژی، روش نوین برای تشخیص بقایای انتی‌بیوتیک ارائه می‌دهد که دقت بالایی دارد و نیاز به زمان و هزینه کمتری دارد (Patel, 2002; Möhrle et al., 2007 and Ferrini et al., 2008).

نتیجه‌گیری

موجودیت بقایای انتی‌بیوتیک در شیر و سایر مواد غذایی از جمله عوامل فوق‌العاده خطرناک و نگران‌کننده برای سلامت مصرف‌کننده‌گان است. بنابراین، در این اواخر روش‌های متعددی به‌منظور دریافت بقایای انتی‌بیوتیک ایجاد شده است و در این مقاله در مورد روش‌های رایج امروزه، مزایا و نواقص آن‌ها پرداخته شده‌است. اینک به‌طور فشرده چنین نتیجه‌گیری می‌شود که؛ روش (ELISA)، روش (PCR) و کروماتوگرافی مایع با فشار بالا دارای دقت بیشتر بوده؛ اما به دلیل گران بودن و زمان‌گیر بودن غیرقابل استفاده در صنعت لبنیات می‌باشند. برعلاوه اخیراً کیت‌های تشخیصی: مانند کیت بیتا استار، دلووتست و سایر کیت‌های تجاری جهت تشخیص کیفی انتی‌بیوتیک‌ها در صنعت لبنیات بیشتر استفاده می‌شوند؛ چون ساده، ارزان و سریع اند. هم‌چنان آزمایشات میکروبی دارای دقت کافی بوده؛ اما نیاز به زمان بیشتر دارند. این آزمایشات نیازمند هزینه کم‌تر اند و از این جمله، آزمایش کشت ماست گزینه خوب برای صنایع تولیدکننده‌ی ماست می‌باشد. روش رنگ‌آمیزی یا نشانه‌گذاری انتی‌بیوتیک در فارم‌های تولیدی کشورهای پیشرفته به پیمانه وسیع مورد استفاده قرار می‌گیرد. حس‌گرهای زیستی به خصوص ترکیب با مواد نانو تکنالوژی، روش نوین و کارا بوده و به زمان و هزینه کم‌تر نیازمند است و همچنان دقت بسیار بالا دارد. بنابراین، ممکن در آینده این تکنالوژی جایگزین سایر روش‌ها در صنایع لبنیات گردد. به‌صورت عموم هر روش ویژه‌گی‌ها، مزایا و نواقص خاص خود را دارد. بنابراین، نظر به امکانات و اهداف مردم، صنایع و کشورها کاربرد و اولیت‌بندی این روش‌ها متفاوت می‌باشد.

منابع

Abouzied, M., Driksna, D., Walsh, C., Sarzynski, M., Walsh, A., Ankrapp, D., & others. (2012). Validation study of the Betastar® Plus lateral flow assay for detection of beta-lactam antibiotics in milk. *Journal of AOAC International, 95*(4), 1211–1221. https://doi.org/10.5740/jaoacint.12-0343

Ahmed, S., Ning, J., Peng, D., & others. (2020). Current advances in immunoassays for the detection of antibiotic residues: A review. *Food Agriculture Immunology, 31*(1), 268–290. https://doi.org/10.1080/09540105.2020.1763154

Akbari Kishi, S., Asmar, M., & Mirpur, M. S. (2017). The study of antibiotic residues in raw and pasteurized milk in Gilan province. *Iranian Journal of Medical Microbiology, 11*(3), 71–77.

Ali, M. S., Vahid, H., & Shokooh, Z. (2015). Detection of antibiotic residue in raw milk in Mashad by Delvo-test. *Biotechnology, 11*, 1–4.

Althaus, R. L., Molina, M. P., Rodriguez, M., & Fernandez, N. (2001). Detection limits of β-lactam antibiotics in ewe milk by Penzym enzymatic test. *Journal of Food Protection, 64*(11), 1844–1847. https://doi.org/10.4315/0362-028X-64.11.1844

Bitas, D., & Samanidou, V. F. (2018). Molecularly imprinted polymers as extracting media for the chromatographic determination of antibiotics in milk. *Molecules, 23*(2), 316. https://doi.org/10.3390/molecules23020316

Bonyadian, M., & Kordi, F. M. (2020). Comparison of yogurt test with commercial kit for detection of antibiotic residues in raw and pasteurized milk. *Iranian Journal of Veterinary Medicine, 14*(4), 229–237. https://doi.org/10.22059/ijvm.2020.295385.1005206

Chen, W., Jie, W., Chen, Z., Jie, X., & Huang-Xian, J. (2012). Chemiluminescent immunoassay and its applications. *Chinese Journal of Analytical Chemistry, 40*(1), 3–10. https://doi.org/10.1016/S1872-2040(12)60002-4

Codex Alimentarius Commission. (2015). *Maximum residue limits (MRLs) and risk management recommendations (RMRs) for residues of veterinary drugs in foods.* CAC/MRL 2-2015. https://www.fao.org/input/download/standards/45/MRL2_2015e.pdf

Daryani, A., Hosseini-Teshnizi, S., & Sharif, M. (2014). Prevalence of microbial contamination in raw milk in the Alborz Province, Iran. *Journal of Parasitic Diseases, 38*(2), 194–197. https://doi.org/10.1007/s12639-013-0374-0

Edberg, S. C., & Edberg, M. H. (2015). *Handbook of food microbiology* (2nd ed.). CRC Press.

European Food Safety Authority (EFSA). (2014). Bánáti, D. European perspectives of food safety. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. https://doi.org/10.1002/jsfa.6698

Fan, G. Y., Yang, R. S., Jiang, J. Q., Chang, X. Y., Chen, J. J., Qi, Y. H., & others. (2012). Development of a class-specific polyclonal antibody-based indirect competitive ELISA for detecting fluoroquinolone residues in milk. *Journal of Zhejiang University Science B, 13*(7), 545–554. https://doi.org/10.1631/jzus.B1200068

Ferguson, D. L., & Adams, M. (2012). Impact of antibiotic residues on milk quality and safety. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 11*(4), 299–316. https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2012.00181.x

Ferrini, A. M., Mannoni, V., Carpico, G., & Pellegrini, G. E. (2008). Detection and identification of β-lactam residues in milk using a hybrid biosensor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56*(3), 784–788. https://doi.org/10.1021/jf703704x

Food and Agriculture Organization (FAO). (2010.). *Guidelines for the use of veterinary drugs in animal husbandry*. http://www.fao.org/3/a-y4762e.pdf

Food and Agriculture Organization (FAO). (2011). *Milk and dairy products in human nutrition*. http://www.fao.org/3/a-i3396e.pdf

Forbes, B. A., Sahm, D. F., & Weissfeld, A. S. (2007). *Bailey & Scott's diagnostic microbiology* (12th ed.). Mosby.

Gao, J., Ferreri, M., Liu, X. Q., Chen, L. B., Su, J. L., & Han, B. (2011). Development of multiplex polymerase chain reaction assay for rapid detection of Staphylococcus aureus and selected antibiotic resistance genes in bovine mastitic milk samples. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 23*(5), 894–901. https://doi.org/10.1177/1040638711422290

Gonzalez, C. A., & Melgarejo, T. (2005). Antibiotics in animal feed: A review of their use, benefits, and risks. *Veterinary Research Communications, 29*(3), 187–201. https://doi.org/10.1007/s11259-005-0002-6

Horvath, C., & Lin, H. J. (1976). Movement and band spreading of unsorbed solutes in liquid chromatography. *Journal of Chromatography A, 126*, 401–420. https://doi.org/10.1016/s0021-9673(01)84088-7

Huang, Z. (2014). Development of an indirect competitive ELISA for detection of danofloxacin residue in milk. *International Food Research Journal, 21*(4), 1419–1424.

International Agency for Research on Cancer (IARC). (2021). *Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*. https://monographs.iarc.who.int/

Kebede, G., Zenebe, T., Disassa, H., & Tolosa, T. (2014). Review on detection of antimicrobial residues in raw bulk milk in dairy farms. *Journal of Applied Sciences, 6*(4), 87–97. https://doi.org/10.3923/jas.2014.87.97

McEwen, S. A., & Collignon, P. J. (2018). Antimicrobial resistance: A one health perspective. *Microbiology Australia, 39*(1), 10–13. https://doi.org/10.1071/MA17090

Möhrle, V., Stadler, M., & Eberz, G. (2007). Biosensor-guided screening for macrolides. *Analytical and Bioanalytical Chemistry, 388*(5-6), 1117–1125. https://doi.org/10.1007/s00216-007-1385-0

Mohsenzadeh, M., & Bahrainipour, A. (2008). The detection limits of antimicrobial agents in cow's milk by a simple yoghurt culture test. *Pakistan Journal of Biological Sciences, 11*(18), 2282–2285. https://doi.org/10.3923/pjbs.2008.2282.2285

Patel, P. (2002). (Bio)sensors for measurement of analytes implicated in food safety: A review. *Biosensors and Bioelectronics, 21*(2), 96–115. https://doi.org/10.1016/s0165-9936(01)00136-4

Shankar, B., Manjunatha Prabhu, B., Chandan, S., Ranjith, D., & Shivakumar, V. (2010). Rapid methods for detection of veterinary drug residues in meat. *Veterinary World, 3*(5), 235–240. https://doi.org/10.5455/vetworld.2010.235-240

Smith, D. S., & Eremin, S. A. (2008). Fluorescence polarization immunoassays and related methods for simple, high-throughput screening of small molecules. *Analytical and Bioanalytical Chemistry, 391*(5), 1499–1507. https://doi.org/10.1007/s00216-008-1740-x

Smith, R. D., & McKellar, Q. A. (2003). Antimicrobial growth promoters: Overview and history. *Journal of Animal Science, 81*(E-Suppl 1), 11–20. https://doi.org/10.2527/jas.2003-109

Tasci, F., Canbay, H. S., & Doganturk, M. (2021). Determination of antibiotics and their metabolites in milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry method. *Food Control, 127*, 108147. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108147

Tornadijo, M. E., Fresno, J. M., & Carballo, J. (2017). Starter cultures for fermented milk products. In *Fermented milks* (pp. 35–57). CRC Press.

U.S. Food and Drug Administration (FDA). (2018). *Guidance for industry: Residues of veterinary drugs in food*. https://www.fda.gov/media/116930/download

Van Boeckel, T. P., Brower, C., Gilbert, M., et al. (2015). Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 112*(18), 5649–5654. https://doi.org/10.1073/pnas.1503141112

Vanderhaeghen, W., Hermans, K., Haesebrouck, F., & Butaye, P. (2010). Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in food production animals. *Epidemiology and Infection, 138*(5), 606–625. https://doi.org/10.1017/S0950268809991142

Wang, G., Zhang, M., Zhao, J., Xia, Y., & Wang, Z. (2018). Assessment of bacterial communities in raw cow milk and their impacts on the quality and safety of milk products. *Food Microbiology, 72*, 153–162. https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.09.015

Wang, Y., Gan, N., Li, T., Cao, Y., Hu, F., & Chen, Y. (2016). A novel aptamer–quantum dot fluorescence probe for specific detection of antibiotic residues in milk. *Analytical Methods, 8*(15), 3006–3013. https://doi.org/10.1039/c6ay00571e

World Health Organization (WHO). (2010). *Report of the WHO Expert Committee on Food Additives: 72nd meeting*. https://www.who.int/foodsafety/publications/chemical-foods/food-additives-report/en/

World Organisation for Animal Health (OIE). (2016). *OIE guidelines on the responsible use of antibiotics*. https://www.oie.int/en/document/oie-guidelines-on-the-responsible-use-of-antibiotics/

Xiu, Y., Luo, R., Han, B., Liu, L., & Wang, H. (2020). Construction of Co@C hybrid nanostructure: Electrochemical biosensor for detection of penicillin sodium in milk. *Food Analytical Methods, 13*, 617–628. https://doi.org/10.1007/s11483-019-00329-5

Zdolec, N., Dobranić, V., Butković, I., Koturić, A., Filipović, I., & Medvid, V. (2016). Antimicrobial susceptibility of milk bacteria from healthy and drug-treated cow udder. *Veterinarski Arhiv, 86*(2), 163–172.

Zhang, Q. Q., Ying, G. G., Pan, C. G., Liu, Y. S., & Zhao, J. L. (2015). Comprehensive evaluation of antibiotics emission and fate in the river basins of China: Source analysis, multimedia modeling, and linkage to bacterial resistance. *Environmental Science & Technology, 49*(11), 6772–6782. https://doi.org/10.1021/acs.est.5b00721

Zhang, Z., Wang, H., Zhang, Y., & Wei, D. (2018). Current advances in immunoassays for detection of small molecules: From simple to simply amazing. *Biosensors and Bioelectronics, 106*, 222–237. https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.01.063